イカ塩辛の微生物学的研究—I

イカ塩辛熟成過程中の酵母菌数および
菌相の変化について

森 勝美・信濃晴雄・秋場 稔

(1977 年 6 月 16 日受理)

Studies on the Microorganisms in Salted and Ripened Squid Meat
Product ("Ika-Shiokara")—I
Yeasts in Ripening Process of "Ika-Shiokara"

Katsumi MORI*, Haruo SHINANO*, and Minoru AKIBA*

Since no means of sterilization is used throughout the manufacturing process of "Ika-Shiokara", the quality of the product is closely related to its microbiological flora. In this paper, the changes in the viable cell count and flora of yeast were investigated throughout the process of "Ika-Shiokara" ripening at 25°C using various concentrations of salt, i.e. 10%, 20% and 30% by weight.

In the early stage of "Ika-Shiokara" ripening using 20% or 30% salt, viable yeast cells occurred at a level of about 10^3 /ml of fluid and then decreased gradually with time. *Rhodotorula mucilaginosa* and *R. minuta* var. *texensis* were dominant among the yeasts recovered which included the genera *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* and *Sporobolomyces*. These results may suggest that the yeasts in "Ika-Shiokara" processed with 20% and 30% salt were not related to the ripening process. However, in the case of "Ika-Shiokara" using 10% salt, the viable cell count increased more than 10^4 fold on the 10th day of the ripening process. The dominant yeast species among the genera *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* and *Trichosporon* were *R. mucilaginosa* till the 4th day and *Deboryomyces kloeckeri* which replaced *R. mucilaginosa* after the 7th day. Strains belonging to the species *D. kloeckeri* have a weak fermentation ability and this species has also been isolated from various fermented foods as a useful yeast. Moreover, an increase of the yeast count was observed in "Ika-Shiokara" processed with 10% salt. These results indicate that the yeasts in "Ika-Shiokara" processed with 10% salt, especially *D. kloeckeri*, may play an important role in the ripening process.

イカ塩辛はわが国古来の伝統的な“水産発酵食品”の一つとして広く嗜好され、その熟成に関しては原材料のイカ肉および内臓に由来する酵素作用が主体をなすものと考えられてはいるものの¹⁾、存在する微生物の発酵作用もまた大きな役割を担っているものと考えられる。その内にあつて酵母の果す役割は共存する他の微生物のそれと同様に無視し得ないものと考えられるが、従来イカ塩辛の酵母に関する研究報告は少く、未だその詳細については明らかにされていない。

喜多²⁾は市販イカ塩辛から genus *Torula* に属する 4 種の酵母を分離しており、また銭谷³⁾はウニ、イカおよびカツオ塩辛など合計 21 種の塩辛から酵母を分離・同定した結果、いずれの塩辛も genus *Debaryo-*

* 北海道大学水産学部水産食品学科食品製造学講座 (Laboratory of Marine Food Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato-machi, Hakodate, 041).

myces および *Zygosaccharomyces* に属する酵母が特徴的に多数検出されることを報告している。また信濃ら⁴⁾は農産発酵食品 14 種、水産発酵食品 10 種について酵母菌相と、酵母および細菌の生菌数の検討を行っているが、その内 2 種類のイカ塩辛からは *Torulopsis gropengieseri*, *Rhodotorula flava* などを分離・同定している。

以上のようにこれまでの報告例は、各塩辛の製品化された時点における酵母について研究されたものであるが、一般に食品の発酵あるいは腐敗現象においては、その初期段階と後期段階では微生物相に差異が認められ、全過程における微生物相は一様ではない。イカ塩辛の熟成過程においても微生物相の変動が考えられ、熟成に主導的な役割を担う菌種を明確にし、その動態を明らかにすることは品質管理の面からも極めて重要と考えられる。

一般にイカ塩辛は、その嗜好性あるいは季節的要因もあつて“甘口”および“辛口”の二つの種類に分けられて製造されており、従つて用塩量の相違による微生物相の変動を明らかにすることが必要である。このような観点から今回、酵母菌数および菌相について一連の検討を行い、二三の新しい知見を得たので以下に報告する。

実験方法

供試イカ塩辛の作製法 供試イカ塩辛は当函館地方において“普通作り”と称される製法に準じて実験室内で作製した。すなわち、スルメイカ (*Todarodes pacificus*) の胴肉を水洗後、水切りを促進するために 1% 食塩水に 10 分間浸漬し取出して十分に水切り細切後、食塩および内臓内容物を添加混合し 1 l 容広口瓶に密閉し 25°C で保存熟成を行つた。食塩添加量は細切肉重量に対し各 10, 20 および 30% (w/w), 内臓量は各 5% (w/w) とした。製造後は毎日 2 ~ 3 回充分に攪拌を行い熟成をはかつた。

生菌数の測定 長尾⁵⁾の方法に倣い供試イカ塩辛の液汁については菌数測定を行つた。すなわち無菌的に液汁を一定期間毎に採取し、ポテトデキストロース寒天培地 (以後 P.D. 寒天培地と略記する。使用直前に滅菌 10% 酒石酸溶液で pH 3.5 ~ 4.0 に修正) を分離培地として混釈培養 (25°C, 5 ~ 7 日間) を行い生菌数を測定した。

分類学的試験法 酵母生菌数の測定を行つたシャーレから無作為に出来るだけ多数の集落を釣菌し、酵母の分離を行つた。なお、得られた分離菌株は更に P.D. 寒天平板培地で画線培養 (25°C, 5 ~ 7 日間) を行い純粋分離菌株とした。得られた分離菌株は、用塩量 10% のイカ塩辛液汁から 687 株、20% のものから 236 株および 30% のものから 233 株の計 1156 株であつた。これらの分離菌株は LODDER ら^{6,7)}の方法によつて形態学的性状、孢子形成能、各種糖類の発酵および同化能、硝酸塩同化能、でん粉様物質生成能などについて試験を行い、稿尾に示すように LODDER らの記載を取りまとめて Tables 4, 5 および 6 に示した Key を作製し、これに従つて分類を行つた。

結果および考察

官能的観察結果 各用塩量のイカ塩辛は熟成が進むに従い原料イカ肉の腥臭が消失し塩辛独特の香気を呈すると共に、細切肉が柔らかくなり、液汁が粘稠性を帯びてくる。この状態が食用に最も適した時期で、用塩量 10% のものでは仕込み後 5 日目から 14 日目までがそのような状態であつた。なおその後弱いアルコール臭様およびアンモニア様臭が感じられたが、25 日目までは食用に供し得る状態であつた。次に用塩量 20% および 30% のものでは多少熟成が遅れ、それぞれ 9 日目および 10 日目頃から食用に最適な状態となり、その後両者とも 15 日目から 19 日目にかけて多少異臭が感じられたが、30 日目に至つてもまだ食用に供し得る状態であつた。

分類学的試験結果

genus *Rhodotorula* P.D. 寒天培地上の集落は鮮明な赤橙色またはピンク色を呈し、糖類の発酵性および孢子形成能ともに無く、本属と認められたものは全供試菌 1156 株中の 875 株で、供試菌株の大部分が

この genus に属する酵母であつた。これらの酵母は糖類および硝酸塩の同化性、細胞形態などから 784 株が LODDER らの記載による *R. mucilaginosa* に、71 株が *R. minuta* var. *texensis* に同定された。

genus *Debaryomyces* 糖類に対する発酵性が全く認められないかあるいは非常に微弱であること、および胞子を形成しその表面に特異的な突起が認められることなどから本属と認められた菌株は 244 株で、これらの酵母はすべて用塩量 10% のイカ塩辛液汁から分離された。本属は、糖類の発酵性が不安定なため、胞子形成能以外の性状では同化性、皮膜の形成能などが species 決定の重要な性状になつている。本属と認められた 244 株はいずれも、グルコース、ガラクトース、サッカロースおよびマルトースを同化し、硝酸塩を同化せず、皮膜の形成も認められないことから LODDER らの記載による *Debaryomyces kloederi* に一致する菌株であつた。

genus *Candida* 本属の特性は胞子形成能のないことと pseudomycelium 形成能を有することにあるが、これらの特性とその他の各種生化学的および形態学的性状から本属と認められたものは 7 株で、その中 3 株は糖類の発酵性が認められず、グルコースおよびラクトースのみを同化し、硝酸塩の同化性を有しないことなどから、LODDER らの記載による *Candida rugosa* に一致する菌株であつた。またその他の菌株も各種性状から 2 株が *C. mycoderma* に、2 株が *C. zeylanoides* に同定された。

genus *Cryptococcus* 胞子形成能、pseudomycelium 形成能共に無く、細胞がカプセルによつて覆われ、でん粉様物質を産生することなどの特徴から本属と認められたものは 9 株で各々糖類および硝酸塩の同化性、種々の形態学的性状から 7 株が *Cryptococcus neoformans* に、1 株が *Cry. diffluens* に、1 株が *Cry. albidus* に同定された。

genus *Torulopsis* 本属と認められたものは 2 株で、1 株は胞子形成能、pseudomycelium 形成能共に無く、また糖類の発酵性、硝酸塩の同化性も認められないが、グルコースの同化性のみを有するなど、LODDER らの記載による *Torulopsis pinus* に一致する菌株であつた。また残り 1 株は、各種形態学的、生化学的性状から、*T. inconspicua* に該当する菌株であつた。

genus *Sporobolomyces* 本属は、集落が赤色または紅鮭色 (salmon-pink) を呈し、胞子は特徴ある

Table 1. Species of yeasts isolated from "Ika-Shiokara" using 10% salt

Species	Numbers of isolates
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	398
<i>R. minuta</i> var. <i>texensis</i>	20
<i>Debaryomyces kloederi</i>	224
<i>Candida rugosa</i>	3
<i>C. mycoderma</i>	2
<i>C. zeylanoides</i>	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2
<i>Cry. diffluens</i>	1
<i>Torulopsis pinus</i>	1
<i>T. inconspicua</i>	1
<i>Trichosporon margaritifera</i>	1
Unidentified	32
Total	687

Table 2. Species of yeasts isolated from "Ika-Shiokara" using 20% salt

Species	Numbers of isolates
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	175
<i>R. minuta</i> var. <i>texensis</i>	55
<i>Sporobolomyces roseus</i>	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
Unidentified	3
Total	236

Table 3. Species of yeasts isolated from "Ika-Shiokara" using 30% salt

Species	Numbers of isolates
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	211
<i>R. minuta</i> var. <i>texensis</i>	16
<i>R. rubra</i>	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4
<i>Cry. albidus</i>	1
Total	233

“腎臓形”または“鎌状”を示す。また pseudomycelium あるいは true-mycelium を形成するものがある。本属と認められたものは2株で、いずれも糖類の発酵性、硝酸塩の同化性がなく、グルコース、ラクトース、サッカロースおよびマルトースを同化するなど *S. roseus* に一致する菌株であつた。

genus *Trichosporon* true-mycelium および arthrospore (節孢子) が認められるも、子のう孢子形成能なく、糖類の発酵性もみられないことから本属と認められた酵母は1株で、この酵母は硝酸塩を同化し、ラクトースを除く糖類の同化性が認められることなどから *Trichosporon margaritifera* に同定された。

なお、分離菌株中、同定し得なかつた菌株は35株で、いずれも孢子形成能および糖類の発酵性がみられず、また、糖類および硝酸塩の同化性、あるいはその他の各種性状から *Cryptococcus neoformans* に類似するが、ガラクトースの同化性が極めて不安定であること、およびこの属の特性のひとつであるでん粉様物質の確認ができなかつたことから *Cry. neoformans* に近縁の菌種と考えられるが、ここでは同定し得なかつた菌株として扱つた。

以上の同定結果から Table 1 に示したように用塩量 10% イカ塩辛の液汁から分離された 687 株は6属 11 種、また Tables 2 および 3 に示したように用塩量 20% からの 236 株は3属 4 種、また用塩量 30% からの 233 株は2属 5 種にそれぞれ分類された。

酵母菌数の変化および菌相の変遷 各用塩量のイカ塩辛の熟成過程における酵母菌数の変化と菌相の変遷はそれぞれ Figs. 1~4 に示す通りである。Fig. 1 にみるように用塩量 20% および 30% の場合には、仕込み直後 10^3 /ml 程度認められた酵母菌数が経時的に減少し、10 日目では検出できなかつた。一方、用塩量 10% のイカ塩辛では、用塩量 20% および 30% の塩辛とは異なり、仕込み後5日目から酵母菌数が増加し、10 日目では最高 10^4 /ml 台の菌数が認められ、以後菌数は減少したが18 日目までは検出可能であつた。次に酵母菌相については、仕込み直後の菌相は Figs. 3 および 4 にみるように用塩量 20% および 30% のイカ塩辛共に *Rhodotorula mucilaginosa* が構成種の主体を成したが、用塩量 20% のものでは仕込み後3 日目を以降は *R. minuta* var. *texensis* が優勢種となり、用塩量 30% のものでは仕込み後4 日目を以降から菌相中に占める *R. minuta* var. *texensis* の比率が徐々に増加して、6 日目では両種が相半ばした。

一方用塩量 10% のイカ塩辛の菌相については、Fig. 2 にみるように、仕込み後4 日目までは用塩量 20% および 30% のイカ塩辛と同様、*R. mucilaginosa* が優勢種であつたが、その後 *R. mucilaginosa* と共に *Debaryomyces hansenii* および同定し得なかつた菌種が、菌相構成員としての比重を増し、7 日目を以降では *R. mucilaginosa* に代つて *D. hansenii* が優勢種となるに至つた。これらの酵母の内、*R. mucilaginosa*

Fig. 1. Changes of viable cell count of yeast in ripening process of “Ika-Shiokara”.

Fig. 2. Changes of yeast-flora in ripening process of "Ika-Shiokara" using 10% salt.

Fig. 3. Changes of yeast-flora in ripening process of "Ika-Shiokara" using 20% salt.

Fig. 4. Changes of yeast-flora in ripening process of "Ika-Shiokara" using 30% salt.

および *R. minuta* var. *texensis* はいずれも自然界で分布が広く、種々の食品からの分離例⁷⁾が報告されているが、イカ塩辛のような発酵食品からの分離例は少ない。またこれら2種の酵母は発酵能がなく菌数も $10^3/\text{ml}$ 程度で、しかも熟成初期から急激に減少することから、イカ塩辛の熟成に大きな役割を果していることの可能性は小さいと思われる。一方用塩量 10% のイカ塩辛でその熟成初期から *R. mucilaginosa* に代つて菌相の主体を成した *D. kleckeri* は分離酵母中、弱いながらも発酵能を有する唯一の酵母であるが、その来源もソーセージ、日本酒の諸味、チーズなど⁷⁾ 発酵食品に関連するものが多く、塩辛類についても、銭谷⁸⁻⁹⁾ がイカを始めウニ、シイラ、カツオ、コノワタなどからこの種の酵母を分離している。また茂木¹⁰⁾ は味噌の熟成に関与する微生物を検討した結果 *Debaryomyces* 属を含めて7属の酵母が優良酵母であると述べている。これらの報告とともに本実験の用塩量 10% のイカ塩辛における菌数の変動と菌相の変遷ならびに官能的観察の結果との関連から *Debaryomyces kleckeri* の塩辛熟成に及ぼす影響は無視し得ないものと考えられる。

なお、以上の分離酵母の来源について、供試イカ塩辛の原材料として用いた生産ルートにおけるイカ肉お

よび内臓に付着している酵母の検討を行つた結果、細切イカ肉洗浄液から 49 株の酵母を分離したが、これらは LODDER の分類法によれば *Rhodotorula mucilaginosa* に属するものであつた。またイカ内臓については 1 g 当り 10^2 程度の酵母が検出され、9 株の酵母を分離したが、その中 4 株が *R. mucilaginosa* で、残る 5 株はいずれも *Cryptococcus* に属し、それぞれ *Cry. diffluens* (1 株)、*Cry. albidus* (1 株) に同定され、3 株は同定出来なかつたが、*C. neoformans* に近縁の種であつた。このことによつて供試イカ塩辛から多数分離された *R. mucilaginosa* および *Cryptococcus* に属する酵母は原材料に由来するものと考えられる。

現在、一般に工場規模の生産による甘口および辛口調整のイカ塩辛は共に、初期段階の熟成は食塩と内臓内容物のみの添加によつて行われ、その後、製品の販売段階で麴あるいは調味料などが添加されて調整がはかられる。従つて、本実験によつてはじめて明らかにされた酵母菌相の変化からみて用塩量 10% 程度の甘口のイカ塩辛ではその初期段階の熟成に対する酵母の役割は無視出来ないものと考えられるが、その詳細については今後一層の検討が必要と思われる。

要 約

用塩量 10%、20% および 30% の各イカ塩辛についてその熟成過程における酵母菌数・菌相の変動を検討し、次のような結果を得た。

1. 用塩量 20% および 30% のイカ塩辛では、生菌数は仕込み直後 10^8 /ml 程度で経時的に減少する傾向を示した。また観察期間中の菌相は、熟成前期では *R. mucilaginosa* が、その後、*R. minuta* var. *texensis* が優勢種となるに至つた。

2. 用塩量 10% のイカ塩辛の場合には、仕込み後 5 日目から生菌数が増加し、10 日目では 10^4 /ml 台に達した。菌相は 6 属 11 種からなり仕込み後 4 日目までは *R. mucilaginosa* が圧倒的に優勢で、その後 7 日目以降では *D. kloeckeri* が優勢種となるに至つた。

3. 用塩量 20% および 30% のイカ塩辛ではその熟成期間を通じ、酵母数が一方的に減少することおよびその菌相構成種に有用種と考えられる酵母の認められないことから、その熟成に酵母が直接的に関与するとは認め難かつた。一方、用塩量 10% のイカ塩辛についてはその熟成初期に酵母数の増加が認められること、および種々の発酵食品において有用酵母とされている *D. kloeckeri* が優勢種であつたことから、その熟成にこの種の酵母が有意的な役割を果しているものと推察された。

Table 4. Key to the species of the genus *Trichosporon*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* and *Torulopsis*

- A. Besides budding cells and pseudomycelium a true mycelium which breaks up into arthrospores.
  - No sugar fermentation.
  - Nitrate utilized.
  - Glucose, galactose, saccharose and maltose assimilated.
  - Mycelium much reduced.
  - ....*Trichosporon margaritifera* (Stautz) Buchwald
- B. Budding cells, pseudomycelium and true mycelium may be present, but no arthrospores.
  - a. Pseudomycelium usually well developed, besides true mycelium may be formed.
    - No sugar fermentative, or a very weak fermentation
    - Glucose and galactose assimilated.
    - ....*Candida rugosa* (Anderson) Diddens et Lodder
    - Only glucose assimilated.
    - No early formation of a pellicle in malt extract culture.
    - ....*Candida zeylanoides* (Cast.) Lang. et Guerra
    - Early formation of a pellicle extract culture.

Table 4. continued

Cells oval or cylindrical; no true mycelium; milk not clotted; occasionally very weak fermentation of glucose.

....*Candida mycoderma* (Reess.) nov. comb.

- b. No true mycelium; pseudomycelium rudimentary or absent.

Carotenoid pigment are manifest.

KNO₃ is not assimilated.

Glucose, galactose, saccharose and maltose are assimilated.

Cells are short-oval or oval, multilateral budding. Generally no pseudomycelium; occasionally primitive development occurs. The color is red.

....*Rhodotorula mucilaginosa* (Jorge) Harrison

Glucose, galactose and saccharose are assimilated.

Cells are oval, multilateral budding. Occasionally a primitive pseudomycelium. The color is orange to red.

....*Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison

Glucose, galactose, saccharose and lactose are assimilated.

Cells are oval, multilateral budding. The color is pink to red.

....*Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison var. *texensis* (Rhaff, Mrak et Williams)

Glucose, galactose, saccharose and maltose are assimilated.

Cells are long-oval, single or in pairs. The color is red to orange red.

....*Rhodotorula rubra* (Demme) Lodder

No manifest carotenoid pigments.

Cells round or oval.

Capsule formation together with the ability to form "starch"; dissimilation strictly oxidative.

Nitrate assimilated.

Lactose assimilated.

....*Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner

Lactose not assimilated.

....*Cryptococcus diffluens* (Zach) nov. comb.

Nitrate not assimilated.

Lactose not assimilated, cells almost round

....*Cryptococcus neoformans* (Sanf.) Vuill.

No "starch" formation, capsule only exceptionally formed; dissimilation oxidative or besides oxidative.

No sugar fermentative.

Only glucose assimilated.

Cells round; culture mucous.

....*Torulopsis pinus* nov. spec.

Cells oval; culture not mucous.

....*Torulopsis inconspicua* nov. spec.

Table 5. Key to the species of the genus *Debaryomyces*

Round and warty ascospores are formed. Pseudomycelium is not formed. Pellicle is not formed on malt extract or only after a very long time of incubation. Cells are round to oval.

No fermentation or a very weak fermentation of glucose only or of glucose and saccharose.

KNO₃ is not assimilated.

....*Debaryomyces hansenii* (Guill. et Péju)

Table 6. Key to the species of the genus *Sporobolomyces*

Spores are asymmetrical, kidney-shaped or sickles shaped; color of the culture is red to salmon-pink.

Nitrate utilized.

Glucose, saccharose and maltose assimilated; galactose weakly or not assimilated.

No true mycelium produced.

....*Sporobolomyces roseus* Kluyver *et* V. Niel

文 献

- 1) 長尾 清・木村喬久: 水産学雑誌, (54), 21-24 (1949).
- 2) 喜多源逸: 工業化学雑誌, **15**, 151-156 (1912).
- 3) 銭谷武平: 九大農学芸雑誌, **12**, 247-253 (1952).
- 4) 信濃晴雄・佐藤正博・秋場 稔: 北大水産彙報, **26**, 207-215 (1975).
- 5) 長尾 清: 北大水産彙報, **2**, 145-150 (1951).
- 6) J. LODDER and N. J. W. KREGER-VANRIJ: The Yeasts, A taxonomic study, North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1952.
- 7) J. LODDER: The Yeasts, A taxonomic study, North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1970.
- 8) 銭谷武平: 九大農学芸雑誌, **12**, 375-381 (1952).
- 9) 銭谷武平: 九大農学芸雑誌, **12**, 383-390 (1952).
- 10) 茂木正利: 醗酵食品 (友田宣孝・坂口謹一郎・山田正一・朝井勇宣編), 共立出版, 東京, 1956, pp. 1-80.